

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500

Publication date: 1988-05-24

Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03

Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD

Requested Patent: JP63119500

Application Number: JP19870125443 19870522

Priority Number(s):

IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04

EC Classification:

Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL: A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98, N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]D<25>=-37+ or -1$ deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm⁻¹; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE: A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION: For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $>=15\times10<4>$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500

Publication date: 1988-05-24

Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03

Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD

Requested Patent: JP63119500

Application Number: JP19870125443 19870522

Priority Number(s):

IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04

EC Classification:

Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL: A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98, N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]D^{25}=-37+$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm⁻¹; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE: A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION: For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $>=15\times10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

① 日本国特許庁 (JP)

② 特許出願公開

③ 公開特許公報 (A) 昭63-119500

④ Int.Cl.
C 07 K 15/14
A 61 K 31/725ABL
ABY識別記号 延内整理番号
8318-4H
7252-4C※審査請求 未請求 発明の数 5 (全13頁)

⑤ 公開 昭和63年(1988)5月24日

⑥ 発明の名称 **硬膜化多糖体 DS 4152 並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤**

⑦ 特許 昭62-125443
⑧ 出願 昭62(1987)5月22日

⑨ 优先権主張 ⑩ 昭61(1986)5月23日 ⑪ 日本 (JP) ⑫ 特願 昭61-118847

⑬ 発明者 井上 和弘 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑭ 発明者 田中 紀子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑮ 発明者 是永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑯ 出願人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

⑰ 代理人 弁理士 有賀 三季 外2名

最終頁に続く

明細書

グラクトース標準)

1. 発明の名称

蛋白含量(%) : 1±0.5 (ローリー・フォ

硬膜化多糖体 DS 4152 並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

リン法、牛血清アルブミン標準)

2. 特許請求の範囲

(1) 比旋光度

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質を有する硬膜化多糖体 DS 4152。

(a) $[\alpha]_D^{25} -37^\circ \pm 1^\circ$ (0.5% 水溶液)

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

(b) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帶

29000±3000

1240, 840(肩), 810(cm^{-1} ; KBr)

(2) 元素分析値

(6) 感光性

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロブ

N 0.51~0.69% S 1.06~1.17%

ルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒

P 0.77~1.06%

には殆ど不溶。

(3) 酸かおよび蛋白質の含量

(7) 色反応

蛋白含量(%) : 57±3 (フェノール-硫酸法,

フェノール-硫酸、アンスロシ-硫酸、ビ

ュレット反応かおよびローリー・フォリン反応

は陽性。水解液のエルソン・モルガン反応およびエンヒドリン反応も陽性。カルバソール反応および坂口反応は陰性。

(8) 酸基性、中性、堿性の区别

pH 6~8 (3% 酢酸水溶液)

(9) 塩成育素および硫酸素、銀の含量

ローダルコース、ローラクトース、 SO_4H_2 および Ag (銀)の含有モル比はローダルコースを1.0としてそれぞれ $1.0 : 0.1 : 7.3 : 0$ である。

四 塩成アミノ酸およびアミノ酸

酸加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シスチニン、アミノピロリン酸、グルコサミン酸およびムラミン酸の存在を認める。

本の範囲第3項記載の血管新生抑制剤。

2. 保膜化多糖体 DS 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

3. 光明の詳細を説明

(臨牀上の有用分野)

本発明は、前項を保膜化多糖体 DS 4152 並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、ミクロコプカス・リ・AT-25の発膜生産物中に細胞障壁作用、感染抑制作用およびインターフェロン誘導作用を有する保膜化多糖体 DP 4639 が存在することが知られて

特開昭63-119500(2)

2. 保膜化多糖体 DS 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

3. リューマチ性関節炎、増殖性網膜炎、乾眼、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4. 保膜化多糖体 DS 4152 を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

5. 保膜化多糖体 DS 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

6. ステロイドが保膜コルチゾイド類、黄体ホルモン類、エストラジオル及びアンドロステン類から選ばれたりのものである特許請求の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

7. リューマチ性関節炎、増殖性網膜炎、乾眼、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症に有効な特許

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-25329号)。

本発明者らは、様々な有用性の期待される保膜化多糖体 DP 4639 について生物学的特性を明らかにすべく検討をなした結果、DP 4639 が強い発熱性を有することを知った。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発熱性物質を除去すべく、更に研究をなしていったところ、DP 4639 は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちの DS 4152 と名づけられた一成分は発熱性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用を有することを見出した。

更にまた、本発明者は、このDS-4152とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の如見に當るものであり、その目的は、新規を炭酸化多糖体DS-4152を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、炭酸化多糖体DS-4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、炭酸化多糖体DS-4152とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本明細書中の「血管新生抑制剤」とは、癌の

物工業技術研究所には、Microspheres sp. AT-25として、PEEK P-5255及びArthropector sp. AT-25としてPEEK SP-1357の番号で登録されている)の培養物から分離されるDP-4639(特開昭56-07301号参照)から、その中に含まれる分子量約 1.5×10^5 以上の発癌性物質等を適当な分子量分離法、例えばゲルろ過法や膜ろ過法、アルコール沈殿法で除くことによつて得られる。

すなわち、アルろ過法にとればDP-4639を適当なゲルろ過媒体、例えば、セファクリル(Sephadex S-300(ファルマシア製))を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高速ゲルろ過クロマトグラフィ

特開昭63-119500(3)

発育、実体形成、創傷の治癒等に従事して重要なだけでなく、腫瘍リニューマテを含む慢性炎症、免疫応答、組織増殖等の病的過程についてもその身体の進展に深く関与している血管の新生作用を認めることをいう。したがつて、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与する病疾患、例えばリューマチ性関節炎、増殖性網膜炎、乾燥、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の炭酸化多糖体DS-4152は、アルスロバクター sp. AT-25(工業技術院微生物

一(東洋ソーダ製G3000 SWカラム使用)を行い、辨別限界(マイド・ボリューム、void volume)にピークを示すフラクション(上部)とマイド・ボリュームにピークを与えた分子量約 $2 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ の範囲に溶出されるフラクション(下部)を各々集め、透析する。

また、膜外戻過は適当を適(例えばAniso社製のTM10、TM30、XM50、PM30やfilters社製のNOVA100、OMEGA100、NOVAGO、OMEGA50等特にTM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはペリスチリック(peristaltic)ポンプによつて加圧(0.5~5 kPa/cm²程度)し、透過液をDS-4152として集めればよい。使用溶媒は、水-エタ

ノール(10:2~3)または水が適当であり、4℃で放置で行なうのが一般的である。

得られた各透析内液を最終後ろ通し、ろ液を数倍量のエタノール中に後ろ下すぐことにより生成する白色沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗つた後、減圧乾燥すれば、目的とするD8-4152(1%前後)と見掛け物質(2%前後)が各々得られる。

こうして得られるD8-4152は以下に述べる物理化学的性質を示す。下記の性質はそのナトリウム塩についてのものである。

(1) 分子量(ケルロ通法による)

28000±3000

(2) 元素分析値(ラットの血を示す)

ルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(3) 色反応

エタノール-硫酸、アンスキン-硫酸、ビニレント反応およびローリー・フォリン反応は陽性。水溶液のエルソン・キルガム反応およびニンヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(4) 増殖性、中性、酸性の区别

pH 6~8(3%濃度水溶液)

(5) 構成糖および硫酸基、磷の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、3-O-Na₂かおよびP(磷)の含有モル比はD-グルコースを1.0としてそれぞれ約1.0:6.1:7.3:0である。

特開昭63-119500(4)

C 24.42~25.76% H 3.34~3.68%

N 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(6) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%) : 5.7±3(エタノール-硫酸法、ガラクトース標準)

蛋白質含量(%) : 1±0.5(ローリー・フォリン法、牛血清アルブミン標準)

(7) 比旋光度

(a)_D²⁵ -37°±1°(0.5%水溶液)

(8) 紫外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯 1240, 840(肩), 810(cm⁻¹; KBr)

(9) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホ

ルム構成アミノ酸およびアミノ酸

酸加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、ジアミノピメリジン酸、グルコサミンおよびムツミン酸の存在を認める。

以上D8-4152は、後記実施例で示す如く、单独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイドと組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤においては、

D8-4152の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもできる。

従来、ブレドニゾロン、ロコメチルアレドニゾロン、デキサメタゾン等のステロイドホルモンが、局麻鎮麻薬、見角膜、ハムスメ

一頸並に実験的に説明された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている。

(Cancer, 39, 1308 (1979) J. Natl.

Cancer Inst., 57, 789 (1979) 及び Pro.

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1170 (1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、雄性ホルモン（アンドロステロン、アンドロソーン、ペタメナソン等）は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、精立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロスタンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンアロピオネット、フルオキシメスチロン等が抗乳癌薬として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている (Oncology, 10, 72 (1984))。

ソロンか及びその誘導体（アセテート、ヘキサクシネット、フォスフェート、アカルアセテート、テトラヒドロフラート、トリメチルアセテート等）；メカルアレドュソロンか及びその誘導体（アセテート、ヘキサクシネット等）；ペタメナソンか及びその誘導体（フォスフェート、バレレート等）が挙げられる。

また、グルココルチコイドのC-11位の水酸基がα配置になつた異性体（たとえば、3,16α-エピヘイドロコーテゾン）も含まれるし、前記グルココルチコイドのテトラヒドロ代謝物（グルココルチコイド活性の有無は関連しない）も含まれる。

更に、雄性ホルモンであるプロゲステロン、

特開昭63-119500 (5)

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体か及びエストロジニンが精立腺癌の治療に用いられている。

前記のD-4192と組合せ用いることできるステロイド用は、雄性ホルモン、実体ホルモン、エストラジン類及びアンドロスタン類等であり、より具体的には次のものが開示される。

(1) アレタナンを母核とするステロイドホルモン、ナカルコルコルチコイドであり、たとえばコーテゾンか及びその誘導体（アセテート、エナンテート、クンダシレート等）；ヘイドロコーテゾンか及びその誘導体（アセテート、ヘキサクシネット、カブロエート等）；アレドュソロンか及びその誘導体；アレドニ

メドロキシプロゲステロンか及びその誘導体（アセテート等）；アイドロゲストロンか及びその17α-アセトキシ誘導体（デュファストン）等が挙げられる。

更にまた、ミネラルコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンか及びその誘導体（アセテート、トリメカルアセテート、エナンテート、フェニルアロピオネット等）も挙げられる。

(2) アンドロスタンを母核とするステロイドホルモン、ナカル、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンか及びその誘導体（アロピオネット、エナンテート、アレレート、カブリレート等）が挙げられる。また、エピテオスターノールか及び

その酵母体、ビビテオスタンがあげられる。さらにフルオキシタステロンかおよびその酵母体、メチルテストロンかおよびその酵母体、ステノロンかおよびその酵母体も含まれる。

(3) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、月経ホルモンであり、たとえば、エストロンかおよびその酵母体、エストラジオールかおよびその酵母体(ベンゾエート、ジプロピオネット、バレレート、ウンデセノエート等)、エストリオールかおよびその酵母体(トリプロピオネット等)があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の構成としては、有効成分を医学的に評価される粗体、賦形剤を含有する種々の形態、例えば次または各種の溶液用剤用に溶解させた液剤、散剤、顆粒

である。注射による投与の場合は通常瓶口の1/3量が適量である。

また、本発明の血管新生抑制剤を沈澱剤用として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

〔発明の効果〕

本発明のDS-4152はそれ单独であつても血管新生抑制作用を有するが、これを更にステロイド剤と組合せるとより強れた血管新生抑制作用を有する。

したがつて、DS-4152单独であつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と組合せたものは相乘的に作用が増強されるので、例えば腫瘍血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として特

特開昭63-119500 (8)

別、散剤、注射用、坐剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤がDS-4152とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記用法の单剤に調製して組合せ剤とすることも、あるいは両成分を含む合剤とし同用化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、静脈内、動脈内、口腔、皮下、直腸内、粘膜内または患部周囲内に投与することができる。その投与量は、成人の瓶口一日量で、DS-4152として1~2000mg程度であり、ステロイド剤は男性ホルモン用、精質コルチコイド剤で100~1000mg、通常30~60mgが適当で、周波していくのが好ましいことがある。プロゲスチロン用では100~1200mgが適当

に有用なものである。

〔実施例1〕

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1 (1)

特開昭58-67301号に記載の方法により得られたDP-4639(50g)を15gの0.1M NaClに溶解し、これを0.1M NaClで平衡化したカラム(セファクリル3-300; 50×80cm)にかけて同溶媒にて洗出し、18mlずつ層出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲルエロマトグラフィー(東洋ソーダ製 03000 SWカラム、溶媒Dとして酢酸カリウム緩衝液(0.05)を行い、ダイド・メリキュームにピークを与えた。

分子量(デイストラム標準)が約 2×10^4 ~ 8×10^4 の範囲に属するフラクションを含む(約700mg)、脱イオン水に対して透析した。透析内液を約50mlまで濃縮後ろ過した。ろ液を約400mlのエタノール中へ投げ下層下して、生成した沈殿を含む、これを90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗つた後、減圧乾燥(50°C、6時間)して目的物DS 4152の白色粉末3.8gを得た。

一方、上記高選ケル再クロマトグラフィーでペイド・パリュームにピークを与えるフラクションを含む(約900mg)、上述のDS 4152の場合と同様に処理して、母液を残り白色粉末として0.18gを得た。

(b) ガラクトース、グルコース、果糖並み糖の構成モル比

液体を1規定量中100°Cで5時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルギトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、果糖並み糖のモル比は、糖並み糖の含量(%)から算出した。

第2表

	ガラクトース	グルコース	果糖	糖
DS 4152	0.1	1.0	2.3	0.6
DP 4639	0.2	1.0	2.3	0.6
母液	0.2	1.0	0.9	0.6

第2表は、グルコースを1.0モルとした場合

昭和63-113500(7)

DS 4152の物理化学的性質および生物学的性質をDP 4639およびその母液と比較して示す。

(i) 糖、蛋白、糖並み糖量(第1表)

第1表

	1) 糖(%)	2) S(%)	3) 蛋白(%)	4) P(%)
DS 4152	5.6	1.11	1.1	0.68
DP 4639	5.4	1.08	1.3	0.68
母液	4.2	0.9	0.8	0.72

- 1)エタノール-硫酸法(ガラクトース検定)
- 2)アントノボラスの方法(C.A.Antonoopoulos, *Anal. Chem. Stand.*, 16, 1521(1962))による
- 3)ローリー-フォリン法(牛血清アルブミン検定)
- 4)チエンらの方法(P.S.Che et al., *Anal. Chem.*, 28, 1756(1956))による。

各の各成分のモル比の1例である。

(ii) 構成アミノ酸とアミノ酸の同定

DS 4152を3規定量中、100°C 1.6時間加水分解した後、常法によりアミノ酸分析計にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、ジアミノピメリン酸、グルコナミン酸およびムラミン酸のピークを認めた。

(iii) 比旋光度: $(\alpha)_D^{25}$ ($\gamma = 0.5$ 、水)

第3表

	比旋光度
DS 4152	-37
DP 4639	-36
母液	-34

(iv) グルコース選出パターン

第1図、第2図および第3図に、それぞれ

DS 4152, DP 4639 などと百分の高濃
アルコールクロマトグラムを示す(東洋ソーダ
製 G 3000 IV カラム使用、溶媒 G 1 M
酢酸カリウム濃度液 50 g, 0.04 M,
標準物質アセトラン T-10 など T-40)。

(i) 紫外吸收スペクトル

2 m / 水溶液にかけて 320 ~ 340 nm
に最大吸収は認められない。

(ii) 紫外吸收スペクトル (IR 質)

1240, 840 (弱) および 810 cm⁻¹ K, 酢
酸化多糖に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主として L-
ガラクトースと D-グルコースから成る糖質
部分にムクミン酸オステアートを介して
アラドクリカン酸の結合した醸造化多糖体で

3月 63-119500 (8)

ると想定される。

(i) 亜急性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行つた
亜急性試験の結果を第4表に示す。

以下余白

(i) DS 4152 の急性毒性(マクス、静注)は、
LD₅₀が 2000 mg / kg 以上であるつた。

実施例 1 (i)

DP 4639 (0.04 M) を 300 ml のエタノール (10 : 3) 溶液に溶解し、 TMIO
瓶 (416 ml, アミコン社製) を用いて、 定
量で加圧 (1.5 kg / cm²) 下、 室温でアルコ
ールした。 上記溶液を追加しながら透過液量が
約 3 L となるまで漏過した。 透過液の濃縮液
(約 50 ml) に 100 mg の酢酸ナトリウムを
加えて溶解した後、 离心分離により得られる
上清を約 500 ml のエタノール中へ搅拌下
した。 生成した沈殿を集め、 90% エタノ
ール、 エタノール、 アセトンの順に洗つた後、
減圧乾燥 (65°C, 5 周間) して DS 4152

試験 用 量 mg / 10 ml	体液上昇量 cm					
	0	1	+	+	+	+
DS 4152	75	0.20	0.10	0.05	0.00	0.00
	37.5	0.20	0.05	0.00	0.00	0.00
DP 4639	1.5	1.55	1.25	1.40	1.80	2.20
	7.5	1.40	2.00	1.80	1.40	2.00
			1.5	1.80	1.70	2.00
				7.5	1.80	1.70
					1.5	1.80
						7.5

+(陽性) - (陰性)

の白色粉末 3.3 g を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す通り、蛋白、糖及び水の含量を除き、実験例 1 (4) の DS 4152 と同一である。

糖含量 56%

水含量 11.3%

蛋白含量 39%

水含量 39.2%

高濃度ゲル用クロマトグラムを第 4 図に示す (0.3000 SW カラム、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5)、0.8 ml/分)。

実験例 2

鳥胚後果膜血管新生阻止試験 (直接法) :

鳥胚を用い、ティラーとフォーツマン

(Nature 297: 307 (1982)) の方法を一

べた。ステロイドとしては、酢酸コーテゾンを 0.5 mg / 鳥胚の量 (血管新生に影響のない量) 用いた。また、比較として、DP 4630 及びエニシドについてもその活性を調べた。この結果を第 5 表に示す。

第 5 表

50% 血管新生阻止量 (ID₅₀ 量)

	DS 4152	DP 4630	エニシド
ID ₅₀ 量 (mg/鳥胚)	3	30	600

実験例 4

実験例 2 と同様の方法で、各種ステロイドと DS 4152 の併用による ID₅₀ 量の変化を検討した。この結果、種々のステロイドに 1.0

特開昭 63-119500 (9)

回改変した以下の方法で行つた。

鳥 (ノーリングクロス) の 4 ~ 5 日齢受精卵の後膜に、生理食塩水で溶解した DS 4152 又はヘパリンを添加し、37°C で培養した。

高濃度加 2 日後には、後膜血管の発達度を生理食塩水のみを添加した对照と比較し、アロビット法により、50% 血管新生阻止量 (ID₅₀ 量) を算出した。

この結果、本実験の DS 4152 の ID₅₀ 量は、100 mg である。これに対し、ヘパリンは、100 mg でも作用を示さなかつた。

実験例 3

鳥胚後果膜血管新生阻止試験 (直接法) :

実験例 2 と同様にして、ステロイドと

DS 4152 を併用した場合の効果について調

べた。DS 4152 を加えれば、それぞれの鳥胚後果膜血管新生阻止活性が 10 ~ 100 倍に増加することが明らかとなつた (第 6 表)。

第 6 表

ステロイド	ID ₅₀ 量 (mg/embryo)	
	単独	DS 4152 (増加) と併用 (倍数)
コーテゾンアセテート	120	0.17 (71 倍)
ハイドロコーテゾン	110	0.16 (69)
アレドニゾロン	130	0.08 (163)
6a-メチルアレドニゾロン	115	0.03 (383)
ベタメサゾン	0.80	0.05 (160)
アトランペロ	100	0.01 (1000)
プロゲステロン	102	0.49 (21)
メトロキサンプロゲステロンアセテート	112	0.42 (27)
17 β -エトライオール	100	0.28 (70)
フルオキシメスチロン	124	0.12 (103)
5a-アンドロスタン	232	0.29 (8)

実験例5

血管新生阻止作用 (orifice 法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR系
雄マウスに皮下もしくは縫口で投与し、6時
間後に血液を採取した。0.313% クエン
ナトリウムで凝固を阻止し、直液法と同様に
5日前受精母牛糞尿液に添加し、2日後に判
定した。この結果を第7表に示す。

第7表

投与ルート	投与量 (mg/4)	血管新生阻止率 (%)
縫口	3	59
	30	264
	300	627
皮下	3	16
	30	378
	300	661

第8表

投与ルート	DS 4152	DP 4630	直液法
皮下	922%	833%	868%
縫口	927%	888%	828%

DS 4152 および DP 4630 は縫口、皮下
いずれの経路によつても受精母牛糞尿液を用
いたことが認められた。

実験例6

血管新生阻止作用 (orifice 法) :

ICR系雄マウスに、生理食塩水に溶解した
DS 4152 を縫口投与した。ステロイドは、
DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水
に溶解して縫口または筋肉内投与した。

投与6時間後に採血し、0.313% クエン

井岡昭63-119500 (10)

この結果から明らかのように、用量依存的
な血管新生阻止作用が認められた。

実験例6

血管新生阻止作用 (orifice 法) :

実験例5と同様にして、ステロイドと
DS 4152 を併用した場合の効果について調
べた。ステロイドとしては、雌マコナシン
を8mg/4gの割合で用い、DS 4152 は30
mg/4g又は300mg/4gとなるよう調整して
加えた。また、比較と DP 4630 および
直液法を用いた。この結果を第8表に示す。た
ゞ、表中の数値は、生理食塩水を同量投与し
て対照マウスより採取した血液を添加した後、
糞尿血管の発達度を100%とした時の阻止
率である。

既ナトリウムで凝固を阻止し、これを直液法
と同様に5日前受精母牛糞尿液に加え、2日後
に血管新生に及ぼす効果を判定した。結果は、
同量の生理食塩水のみを投与したマウス、
6時間経過後の血液を加えた場合の糞尿血管
の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。
この結果は第9表の通りである。

以下余白

特開昭63-110500 (11)

実施例8

沈殿部試験：

CS78L/6速マクスに同系の用具由来度水槽器M5076を 1×10^6 個皮下投与し、3日目よりDS 4152を30mg/41日1回皮下投与したところ、著名な沈殿部効果と生存日数の有効な延長が認められた。すなわち第10表に示すように移植21日目の腫瘍平均重量は対照群の37% (63%抑制) であり、かつメテイアン生存日数が対照群より33%延長した。

・腫瘍平均重量は、腫瘍塊の長軸と短軸の長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長軸}) \times (\text{短軸}) \times \frac{1}{2}$$

物質名 (ルート)	DS 4162投与群		血管新生阻止群 (%)	
	投与量 (mg/kg)	(kg/41日: %)	投与量 (mg/kg)	(kg/41日: %)
コーアシブセーター (p.o.)	0	0	0	27
アトラハイドロ (p.o.)	1	30	30	78.1
エビオスター (1.0mL)	0	0	0	-2.6
			0	71.7
			0	-12.3
			0	80.7
			0	4.0
			0	6.2
			0	18.4
			0	23.4
			100	24.2
			30	37.0

薬剤名	腫瘍平均重量 (g/41日: %)	
	投与量 (mg/kg)	(kg/41日: %)
M5076	0	2302016 (100)
DS 4162 投与群	30	0.923006 (37)

(移植21日目の腫瘍重量と生存日数、(1)は平均重量。

(2)は生存日数)

実施例9

沈殿部試験：

ICR系雄マクス(5週齢)にマルコマ180 (8180)を 1×10^6 個皮下投与し、3日目より肿瘤コートゾンの生理食塩水懸濁液を250mg/41日/日の割合で3日間、100mg/41日/日の割合で1日投与した。

DS 4152は生理食塩水に溶解し、0.61もしくは0.1mg/マクスとなる様1日1回皮下もしくは經口にて4日間投与した。移植7日目に腫瘍して腫瘍重量を対照と比較したところ第1表に示す如く肿瘤コートゾンのみを投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与群と遜がをかつたが、さらにDS 4152を投与することにより腫瘍を増殖阻止作用が得ら

九、对照群の腫瘍重量の69~175%であった。

表11表

処理	腫瘍重量	
	平均重量 標準誤差	t/c%
生理食塩水(+)	Q361± Q191	1000
生理食塩水(+) +赤城コーテン	Q391± Q122 Q340± Q162	1000 175 942
DS 4152 (Q61mg/mouse +)	Q361± Q070	1000
DS 4152 (Q1mg/mouse +)	Q261± Q077	723
DS 4152 (Q61mg/mouse +) +赤城コーテン	Q063± Q018	175°
DS 4152 (Q1mg/mouse +) +赤城コーテン	Q028± Q011	74°
DS 4152 (Q61mg/mouse +)	Q322± Q071	824
DS 4152 (Q1mg/mouse +)	Q355± Q115	908
DS 4152 (Q61mg/mouse +) +赤城コーテン	Q063± Q036	161°
DS 4152 (Q1mg/mouse +) +赤城コーテン	Q038± Q015	89°

*P<0.05, **P<0.01 テストによる

図版No.3-119500 (12)

実用例10

照射用:

DS 4152 0mg, 丸薬300mg, トクモ
コシデンブン144mg, カルボキシメチルセ
ルロースカルシクム30mg及びヒドロキシア
ロビルセルロース20mgを用い、常法に従つ
て300mgの照射用を調製した。この照射用
は虚状にもかかわらず850.0mg~5mgを服用
する。

実用例11

照射用:

DS 4152 1.2mg, 塩化ナトリウム90
mgを注射用蒸留水に溶解し、1.0mlとする。
この溶液をメンブランフィルターで通過した
後、アンプルに充填し、115℃で30分間

使用し照射用とする。

実用例12

照射用:

DS 4152 0mg, プレドニゾン20mg,
丸薬50mg, トクモコシデンブン135mg,
カルボキシメチルセルロースカルシクム5mg,
ヒドロキシアロビルセルロース3mg及びステ
アラン酸マグネシクム0.5mgを常法に従つて
混合、打綿し、1袋とする。

4 図面の簡単な説明

第1図ないし第4図は高速ゲルクロマト
トグラムである。

以上

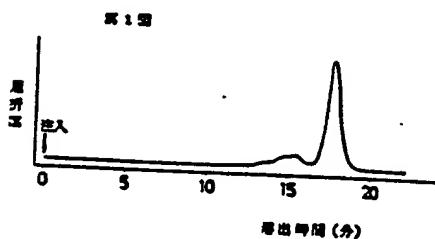
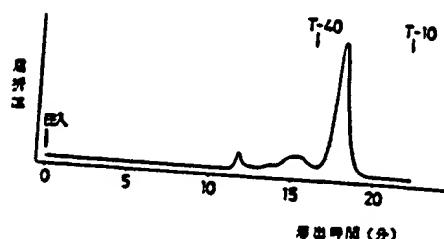
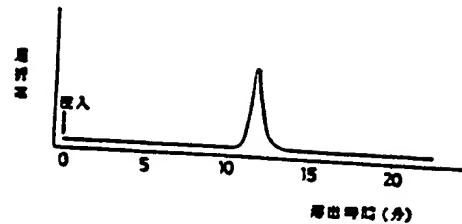


図2図

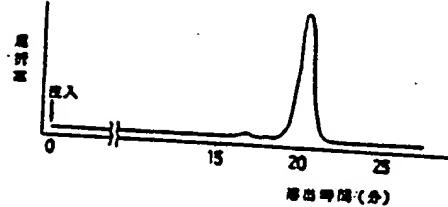


3月63-119500 (13)

第3図



第4図



第1頁の続き

①Int.Cl.
A 61 K 31/725
37/02
C 08 B 37/00
C 12 P 19/04
/(A 61 K 31/725
31:56)

識別記号	厅内整理番号
ADU	8815-4C
ABE	6779-4C
	C-8515-4B
	7252-4C

②発明者 小河 秀正 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内